第7卷第3期　　动 物 学 研 究　　Vol.7, No.3
1986年8月　　ZOOLOGICAL RESEARCH　　Aug., 1986

蛇毒中γ-谷氨酰转肽酶

周德义　梁熙南　吴祥湜　魏　琦

（广西医学院生化教研室　　南宁）

摘　　要

γ—谷氨酰转肽酶（简称γ-GT）广泛存在各种哺乳动物组织中，在氨基酸转运中起重要作用。我们对分属于眼镜蛇科、蝰科和海蛇科的九种毒蛇的蛇毒进行研究，发现蛇毒中存在γ-GT，但各种蛇毒的总酶活力差异很大，以眼镜王蛇和眼镜蛇毒含量较丰富。聚丙烯酰胺凝胶电泳和凝胶等电聚焦电泳分析指出，大多数蛇毒含多种形式的γ-GT，存在分子量与等电点不同的酶区带。

关键词　γ-谷氨酰转肽酶　蛇毒　酶活力

γ-谷氨酰转肽酶（γ-Glutamyl transpeptidase，简称γ-GT EC. 2.3.2.2），广泛存在于哺乳动物的各种组织中。蛇毒中存在多种酶，有天然酶库之称，其中是否存在γ-GT，迄今国内外尚未见报道。我们发现蛇毒中存在γ-GT，并选择分属于眼镜蛇科的眼镜王蛇〔*Ophiophagus hannah* (Cantor)〕、眼镜蛇（*Naja naja atra*）、金环蛇〔*Bungarus fasciatus* (Schneider)〕、银环蛇（*Bungarus multicinctus* Blyth），蝰科中蝰亚科的圆斑蝰泰国亚种（*Vipera russelli siamensis* Smith）、蝮亚科的蝮蛇〔*Agkistrodon halys* (Pallas)〕、尖吻蝮蛇（*Deinagkistrodon*），海蛇科的青环海蛇〔*Hydrophis cyanocinctus* (Daudin)〕和平颏海蛇（*Lapemis hardwickii* Gray）等九种毒蛇的蛇毒为材料，比较γ-GT在这些蛇毒中的分布特点及电泳行为。实验证明γ-GT在蛇毒中的分布存在蛇科的专一性，同工酶谱在不同蛇种的蛇毒中既存在某些相似之处，同时也存在很大差异。

材料与方法

（一）冻干蛇毒粉　除蝮蛇及尖吻蝮蛇毒为浙江产外均为广西产，由广西生物制品联合公司赠。

（二）试剂与仪器　N-甲萘基盐酸二氨基乙烯（简称NED·2HCl），Sigma产

本文1985年8月19日收到，1985年11月18日收到修改稿。

品。电泳用高分子量标准蛋白、Pharmarlyte, Pharmacia产品。Triton X-100等其余试剂均为国产分析纯试剂。KGJ-2分光光度计、酸度计等仪器，国产。管状梯度凝胶制备装置，自制。

（三）方法

1. **γ-GT比活力测定** 根据Tate等改良法(1974)。取底物液〔含0.05mole/l Tris-HCl缓冲液（pH8.0）、2.5mmole/l γ-谷氨酰对硝基苯胺，20mmole/l双甘肽、75mmole/l NaCl〕2ml，样品液（10mg蛇毒/ml）50μl，37°C水浴中保温30分钟后立即加入1.5*N*醋酸2ml终止反应，410nm测吸光度，求酶活力单位（37°C，1分钟使底物转变为1μmole产物的酶量称为1单位）。

2. **4—30%聚丙烯酰胺梯度凝胶盘电泳与γ-GT活力定位和分子量测定** 利用特制的凝胶梯度仪和管状梯度凝胶制备装置制备4—30%聚丙烯酰胺梯度凝胶，凝胶中含Triton X-100约1%（周德义，1985），再参照Kojima（1980）等法进行电泳。一支凝胶管加高分子量标准蛋白（HMW）约60μg，其余各管分别加1%的各种蛇毒样品液30或40μl。10°C 70V预电泳30分钟后升高电压至260V恒压电泳4—5小时。标准蛋白管用氨基黑10B染蛋白，待测样品各管进行γ-GT活力定位染色〔染色液含0.2mmole/l Tris-HCl缓冲液(pH8.3)，4mmole/l γ-谷氨酰对硝基苯胺，80mmole/l双甘肽、1g/l亚硝酸钠、4g/l N-甲萘基盐酸二氨基乙烯（NED·2HCl）〕(Selvaraj等，1982)。分别求出标准蛋白和各样品γ-GT在凝胶中的相对迁移率（Rf），以确定样品γ-GT的分子量。

3. **等电聚焦电泳与γ-GT等电点的测定** 用管型凝胶等电聚焦法(莽克强等,1975)制备7%聚丙烯酰胺凝胶，内含两性电解质载体（Pharmalyte）（pH3—10）约1%，各管分别加蛇毒样品，用空白胶对照，10°C，2—3mA/管稳流电泳30分钟后升高电压至350V，恒压电泳4—5小时，当电流接近0时终止电泳。空白胶按0.4cm长度切为小段，分别放入装有2.0ml重蒸馏水（pH7.0）的小试管中，10°C浸泡16—17小时，测各管的pH。以pH为纵座标，胶长度为横座标绘制空白胶的pH分布曲线。其余含蛇毒样品的凝胶浸入0.2mole/l Tris-HCl缓冲液（pH8.5）中平衡10—20分钟后，按前述γ-GT酶定位染色法染色，测定凝胶中酶区带的准确位置，再从pH分布曲线上找出相应的等电点。

4. **蛋白含量的测定** 按Lowry法。

结 果

（一）**九种蛇毒中γ-GT比活力** 九种毒蛇蛇毒的比活力列于表1。

由表1可见，上述九种蛇毒中都含有γ-GT，但蛇种差异非常大。从蛇科来看，主要分布在眼镜蛇科，海蛇科次之，蝰科含量极微。含量最多的眼镜蛇毒与含量最少的蝮蛇毒相比，γ-GT活力相差百倍以上。在同属于眼镜蛇科的四种蛇毒中，γ-GT主要分布在眼镜蛇与眼镜王蛇毒中，两种环蛇毒含量较低。

（二）**蛇毒中γ-GT酶定位染色与分子量的测定**

1.九种蛇毒经凝胶电泳后进行γ-GT酶定位染色结果如图1所示。眼镜王蛇和眼镜蛇毒存在一强一弱两条γ-GT酶活性带，青环海蛇和平颏海蛇毒也各显两条酶活性带，但活性弱得多。两条γ-GT活性带迁移一快一慢，几种蛇毒之间有一定相似性。其它几种蛇毒尽管γ-GT都显示一定的酶活力，但用酶定位的方法在凝胶上却看不到明显的区带。可能由于γ-GT含量微，受实验方法灵敏度所限之故。

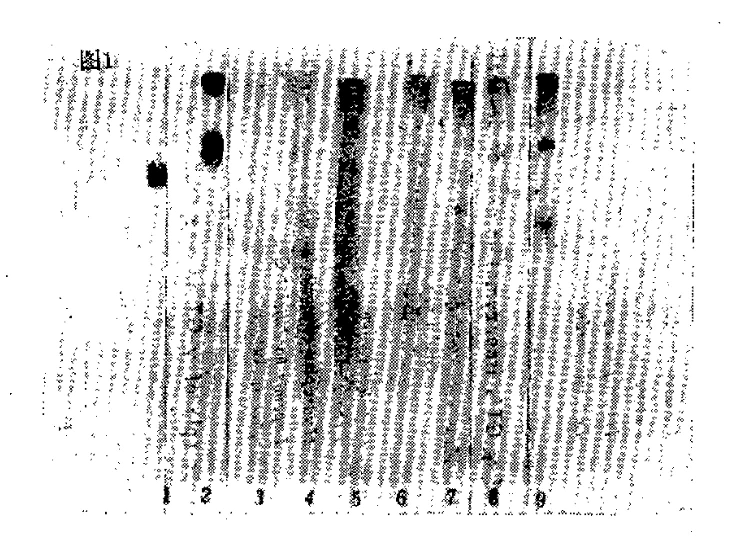


Fig. 1　Electropherogram of the localization of γ-GT on polyacrylamide gels in snake venoms

1.*Ophiophagus hannah* (Cantor)　　2.*Naja naja atra*
3.*Bungarus fasciatus* (Schneider)　　4.*Bangarus multicinctus* Blyth
5.*Agkistrodon halys* (Pallas)　　6.*Deinagkistrodon*
7.*Vipera russelli siamensis* Smith　　8.*Hydrophis cyanocinctus* (Daudin)
9.*Lapemis hardwickii* Gray

2.九种蛇毒中γ-GT的分子量　　按方法所述分别求出浓度梯度凝胶中标准蛋白与蛇毒样品的γ-GT区带的相对迁移率（Rf值），以标准蛋白分子量对数对Rf作图绘制标准曲线（图2）。再根据各蛇毒样品中γ-GT的Rf值，从曲线中查出相应的γ-GT的分子量。九种蛇毒样品的γ-GT分子量列于表2。由表可见眼镜王蛇毒、眼镜蛇毒、青环海蛇毒和平颏海蛇毒都含有两种分子量的γ-GT，低分子量组分变化在15—25万之间，高分子量组分在80万左右。但眼镜王蛇毒例外，它的高分子量组分为55万。

（三）蛇毒γ-GT的等电点　　表3是九种蛇毒经等电聚焦电泳，γ-GT酶定位显色，根据γ-GT在凝胶中的位置再从凝胶pH分布曲线查出相应的各γ-GT区带的等电点。

在梯度凝胶电泳中，几种γ-GT含量较高的蛇毒呈两条酶活性带，当进行等电聚焦

Table 1. Specific activities of γ-GT in nine crude snake venoms

Snake venom	Specific activities of γ-GT (u/mg crude venom)	Snake venom	Specific activties of γ-GT (u/mg crude venom)
Ophiophagus hannah (Cantor)	4.29×10^{-3}	*Deinaghistrodon*	9.99×10^{-5}
Naja naja atra	8.13×10^{-3}	*Vipera russelli siamensis* Smith	1.37×10^{-4}
Bungarus fasciatus (Schneider)	2.21×10^{-4}	*Hydrophis cyanocinctus* (Daudin)	3.26×10^{-4}
Bungarus multicinctus Blyth	1.65×10^{-4}	*Lapemis hardwickii* Gray	6.67×10^{-4}
Agkistrodon halys (Pallas)	4.78×10^{-5}		

Table 2 Estimated molecular weight of γ-GT's isoenzymes in nine crude snake venoms

Snake venom	MW × 10⁴			Snaka vanom	MW × 10⁴		
	1.	2.	3.		1.	2.	3.
Ophiophagus hannah (Cantor)		55	20	*Deinaghistrodon*			
Naja naja atra	80		25	*Vipera russelli siamensis* Smith		50	
Bungarus fasciatus (Schneider)				*Hydrophis cyanocinctus* (Daudin)	80		15
Bungarus multicinctus Blyth	80			*Lapemis hardwickii* Gray	80		20
Agkistrodon halys (Pallas)							

Table 3 Isoenzymatic isoelectric points (pI) of γ-GT in nine crude snake venoms

Snake venom	pI					Snake venom	pI				
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
Ophiophagus hannah (Cantor)	4.65	4.90	5.00	6.40		*Deinaghistrodon*	4.25				
Naja naja atra	5.26	6.30	6.80	7.35	8.20	*Vipera russelli siamensis* Smith	4.10				
Bungarus fasciatus (Schneider)	4.10					*Hydrophis cyanocinctus* (Daudin)	4.20	6.30			
Bungarus multicinctus Blyth	4.20					*Lapemis hardwickii* Gray	4.20	6.40	6.60		
Agkistrodon halys (Pallas)	4.10	8.10									

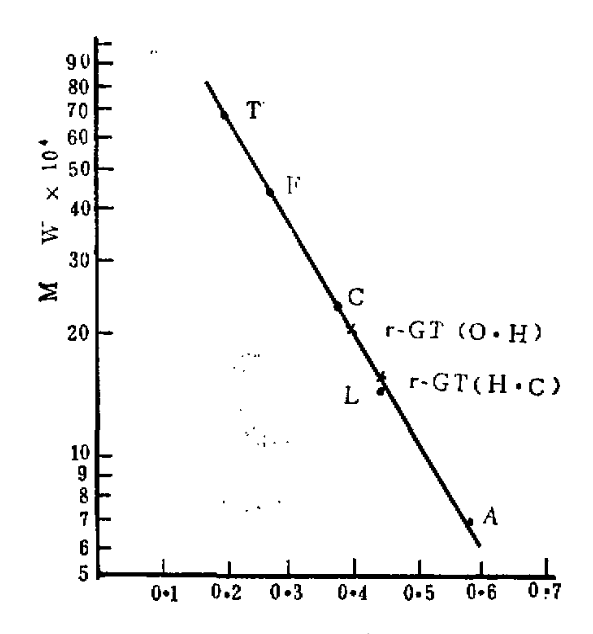


Fig. 2 Estimation of the molecular weight of γ-GT's isoenzymes in snake venoms by polyacrylamide 4/30 gradient gel electrophoresis (contained about 1% Triton X-100 in the gel)

T-	(Thyroglobulin)	669,000
F-	(Ferritin)	440,000
C-	(Catalase)	232,000
L-	(Lactate Dehydrogenase)	140,000
A-	(Albumin)	69,000

O.H-*Ophiophagus hannah*(Cantor)
H.C-*Hydrophis cyanocinctus* (Daudin)

电泳时酶活性带增多，如眼镜蛇毒γ-GT多达5条酶区带。在酶活性较低的几种蛇毒的梯度凝胶电泳图上看不出明显的酶活性带，此时都可以观察到弱的酶活性带。各种蛇毒的γ-GT等电点多在4—7之间。除眼镜蛇毒和眼镜王蛇毒外，其他蛇毒都存在一条pI接近4.20的区带。

讨 论

γ-GT属于转移酶类，在体内它能催化还原型的谷胱甘肽脱下γ-谷氨酰基，并使后者转移到氨基酸或肽上，从而生成一种新的γ-谷氨酰肽。这种酶广泛存在于生物组织中，

在物质代谢中起重要作用。蛇毒是毒蛇毒腺分泌物，它除了含毒蛋白外，尚含多种酶，已发现的近30种酶（涂光俦、冉永禄，1983；Iwanaga等，1979）。这些酶大多是水解酶，虽然大多数酶本身不是毒蛋白，但在蛇伤中起一定作用。我们证实蛇毒中存在γ-GT。这种转移酶类在细胞的氨基酸转运中起重要作用，但蛇毒中存在γ-GT有什么生物学意义则是一个有待进一步探讨的问题。

γ-GT 主要分布于眼镜蛇科的眼镜王蛇和眼镜蛇的毒液中，分布上具明显的“蛇科专一性”。文献报道谷丙转氨酶，过氧化氢酶，淀粉酶，β葡萄糖胺酶，乳酸脱氢酶和肝素酶等某些酶仅存在少数几种蛇毒中（Iwanaga等，1979），看来γ-GT也属于这一类分布专一的酶。

在我们的实验中，浓度梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳和等电聚焦电泳都显示多条γ-GT酶活性带，说明蛇毒中存在多种形式γ-GT。很多研究报告指出人体组织和动物组织的γ-GT存在多型性，我们在人胎各种组织γ-GT的研究中也得到类似的结果（吴祥禔等，1985)。

文献报道从哺乳动物肝、肾等组织纯化的γ-GT，其分子量多在9—12万之间(Shaw等，1980)，有报道指出纯化γ-GT当除去去垢剂放置后分子量增大(Echetebu等，1982)，作者认为这是由于除去去垢剂后酶分子重新发生聚集而引起的。我们在胎儿组织γ-GT的研究中也得到多种分子量的γ-GT同工酶，肝脏和胆汁的γ-GT最低分子量组分是8万，同工酶之间分子量似乎存在一定倍数关系，这个结果提示可能存在分子的聚集（吴祥禔等，1985）。蛇毒也存在两组不同分子量的酶，其分子量较高。蛇毒γ-GT与哺乳动物组织中的γ-GT的这种区别，其原因主要是酶来源不同，此外，也不能排除酶分子本身聚集或酶分子与蛇毒中其他成分形成复合物等因素的影响。

参 考 文 献

周德义 1985 介绍一种制备管状梯度凝胶的装置。生物化学与生物物理进展（1）：71—72

莽克强、徐乃正、方荣祥 1975 聚丙烯酰胺凝胶电泳：81—87。科学出版社

涂光俦、冉永禄 1983 近年来蛇毒酶研究的进展。蛇毒的生化、毒理和应用：1—8 中国生物化学会专题讨论会文集（2）。科学出版社

吴祥禔、周德义、梁熙南、魏琦 1985 人胎γ-GT的浓度梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳与等电聚焦电泳分析。生物化学与生物物理进展（1）：54—56

Echetebu, Z. O. and Moss, D. W. 1982 Multiple forms of human γ-glutamyl transferase --preperation and characterization of different molecular weight fractions. *Enzyme*. 27:1-8

Iwanaga, S. and Suzuki, T. 1979 Enzymes in snake venoms. "Snake venoms". Handb. Exp. pharm. 52:61-145 (Chen Yuan Lee Ed). Springer-Verlag, Berlin, Heideberg, New York

Kojima, J., Kanatani, M., Nakamura, N., Kashiwagi, T., Tohjoh, F. and Akiyama, M. 1980 Electrophoretic fractionation of serum γ-glutamyl transpeptidase in human hepatic cancer. *Clin. Chim. Acta*. 106:165-172

Selvaraj, P. and Balasubramanian, K. A. 1982 Localization of γ-GTP on polyacrylamide gels using L-γ-glutamyl-p-nitroanide as substrate. *Clin. Chim. Acta*. 121(3):291-300

Shaw, L.M., Petersen-Archer, L., London, J. W. and Marsh, E. 1980 Electrophoretic, kinetic and immunoinhibition properties of gamma-glutamyl transferase from various tissues compared. *Clin.Chem.* 26(11):1523-1527

Tate, S. S. and Meister, A. 1974 Interaction of r-glutamyl transpeptidase with amino acids, dipeptides, and derivatives and analogs of glutathione. *J. Biol. Chem.* 249:7593-7602

THE GAMMA-GLUTAMYL TRANSPEPTIDASE IN SNAKE VENOMS

Zhou Deyi　Liang Xinan　Wu Xiangshi　Wei Qi

(Department of Biochemistry, Guangxi Medical College Nanning)

The gamma-glutamyl transpeptidase (γ-GT, E. C. 2. 3. 2. 2) has been found in nine species of snake venoms. The specific activity of γ-GT in these venoms is different. The enzymatic activity of γ-GT from *Naja naja atra* is the highest. The results obtained from the PAGE and isoelectric focusing electrophoresis show that there are multiple forms of γ-GT in snake venoms.

Key words

Gamma-glutamyl transpeptidase

Snake venoms

Enzymatic activity